Lane Medical Library
STANFORD UNIVERSITY APR 26 1938 LIBRARY

Aus der Medizinischen Universitäts-Klinik zu Kiel.
Direktor: Professor Dr. H. Löhr.

Stammt ein Teil der im in vitro überlebend gehaltenen Blut auftretenden Milchsäure aus dem Eiweißabbau?

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
DER HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT
ZU KIEL

vorgelegt von

Hans Arkenau
aus Wilhelmshaven.

KIEL 1936

Gedruckt in der Dissertationsdruckerei von Robert Kleinert, Quakenbrück.

Nr. 17.
Rektoratsjahr 1936/37.

Referent: Dozent Dr. med. Stockinger.
Korreferent: Dozent Dr. med. Chrometzka.

Zum Druck genehmigt: Professor Dr. Löhr, Dekan.

Stammt ein Teil der im in vitro überlebend gehaltenen Blut auftretenden Milchsäure aus dem Eiweißabbau?

Im in vitro überlebend gehaltenen Blut findet Glykolyse statt, hervorgerufen durch Wirkungen von Fermenten, die innerhalb der lebenden Zellen wirken, oder direkt aus diesen stammen. Als Endergebnis dieser Glykolyse sehen wir auf der einen Seite Zuckerschwund, auf der anderen Seite eine Produktion von Milchsäure. Die glykolytischen Fähigkeiten des Blutes werden zum ganz überwiegenden Teil den Leukocyten zugeschrieben, doch bestehen keine quantitativen Beziehungen zwischen Milchsäureproduktion und Zellzahlen, wohl eine Abhängigkeit von der Zellgranulation (Stockinger und Freese). Als Maßstab für die ablaufenden glykolytischen Prozesse im Blut stellen Stuber und Lang die Milchsäurezunahme hin und zwar soll die nachweisbare Milchsäure das Minimum der überhaupt gebildet gewesenen darstellen, da ein Teil der gebildeten Milchsäure sich angeblich durch weiteren Abbau dem Nachweis entziehen kann.

Nun wird, wie Kraske schon zeigte, im Menschenblut erheblich mehr Milchsäure gebildet, als nach dem scheinbaren Zuckerumsatz zu erwarten wäre. Es kann, wie auch Partos und Herzog bestätigen, ein gesetzmäßiger Zusammenhang zwischen Zuckerverlust und Milchsäure-Produktion nicht festgestellt werden. Es müssen neben den glykolytischen Prozessen noch andersartige Vorgänge ablaufen, die durch das Nachliefern von zusätzlichen Kohlehydraten das Gleichgewicht Milchsäure : Kohlehydrat scheinbar zu Gunsten der Milchsäure verschieben. Nach Partos und Herzog handelt es sich um Freiwerden von Zucker durch die Wirkung autolytischer Fermente. Eine ähnliche Ansicht vertritt v. Noorden, der die Herkunft eines Teils der überschüssig auftretenden Milchsäure auf ein nicht bestimmbares, in den Zellen selbst vorkommendes Kohlehydrat bezieht. Auch von anderen Autoren her ist bekannt, daß die Leukocyten tatsächlich Kohlehydrat enthalten und in bestimmten Funktionsphasen abgeben. Stockinger und Freese nehmen an, daß beim Abbau der Zellgranulation Kohlehydrate freigesetzt werden, die in dem komplexen Baumaterial der Granula vorher schon in gebundener Form enthalten waren.

Die überschüssig gebildete Milchsäure braucht nun aber nicht nur aus der Spaltung von Kohlehydraten entstehen. Es wäre immerhin auch möglich, daß durch Desaminierung aus Eiweiß Milchsäure entstehen könnte. Bei dieser Art der Milchsäurebildung müßte aus den Aminosäuren Ammoniak freiwerden und damit der Ammoniakgehalt des Blutes zunehmen.

In den vorliegenden Untersuchungen habe ich nun versucht, festzustellen, ob im in vitro überlebend gehaltenen Blut tatsächlich der Ammoniakgehalt zunimmt, was ja bei einer proteinogenen Herkunft eines Teils der Milchsäure nötig wäre.

Um Ammoniak im Blute nachzuweisen, bediente ich mich der Methode von Denis und Folin.

Einem Patienten wurden aus einer Armvene 20 ccm Blut mit einer mit isotonischer Natriumcitralösung beschickten Spritze entnommen. Folin und Denis machten ihre Versuche mit Oxalatblut. Um aber das Blut überlebend zu halten für Versuche 2 Stunden nach Entnahme, wurde die Gerinnung verhindert durch Natriumcitrat, das die Vitalität der Zellen nicht zerstört. Die Verdünnung Citratlösung : Blut betrug 1 : 9 und ist bei den Ergebnissen bereits in Anrechnung gebracht. Von diesem Citratblut wurden zur sofortigen Ammoniakbestimmung 5 ccm in eine Analysenwaschflasche gegeben und an einen Durchlüftungsapparat angeschlossen, der aus einer Wasserstrahlluftpumpe und einer Waschflasche bestand. Letztere beschickt mit 10 ccm 1/100 n-Schwefelsäure und 2 Tropfen Methylrot-Indikator. Zu dem Blut in der Flasche, die mit einem Glasstöpsel, bestehend aus einem Entlüftungsrohr und einem Eintauchrohr versehen ist, setzt man 3 ccm 20proz. Sodalösung, die das Ammoniak aus seiner Verbindung mit dem Blut lösen sollte. Vor die Flasche mit Blut schaltet man eine mit aqua dest. beschickte Luftfilterflasche, um das Luftammoniak fernzuhalten. Die Analysenwaschflasche wird für 45 Minuten in ein Wasserbad von 56 Grad gestellt, um etwaige fermentative Wirkungen auszuschalten. Jetzt wird durch diese Apparatur ein Luftstrom durchgesaugt, durch den in der Minute etwa 5 Blasen in der Flasche aufsteigen. Das freiwerdende Ammoniak wird auf diese Weise aus dem Blut gesaugt und quantitativ in der Waschflasche aufgefangen.

Ein Versuch dauerte etwa 66 Minuten.

Den Inhalt der Waschflasche habe ich dann mit 1/100 n-Natriumhydroxydlösung bis zur Gelbfärbung zurücktitriert und den Säureverbrauch berechnet nach den Angaben Denis, wonach 1 ccm 1/100 n-Schwefelsäure 0,17 mg Ammoniak entspricht.

In den Versuchen, die ich mit dieser Methode durchführte, fand ich folgende Werte, umgerechnet auf 100 ccm Vollblut.

Tabelle 1.

Nr.	Leukozyten	Ammoniak
1	5720	0,76 mg%
2.	9010	1,88 „
3.	8560	1,586 „
4	6150	1,132 „
5	3800	0,946 „
6	11630	1,888 „
7	7920	0,906 „
8	5590	1,284 „
9	4820	1,36 „
10	6570	1,586 „

Zu dieser Tabelle kann man sagen, daß die Ammoniakwerte dieser Versuche etwa den von Denis angegebenen Werten entsprechen. Eine Abhängigkeit des Ammoniakgehaltes des Blutes von der Zahl der Leukozyten ist nicht festzustellen. Weitere Versuche ergaben ähnliche Werte.

Von den entnommenen 20 ccm Citratblut wurden sofort nach Entnahme weitere 5 ccm in eine weitere Analysewaschflasche gefüllt, die sofort verschlossen wurde, um ein etwaiges Entweichen von Ammoniak auszuschließen und dann für 2 Stunden in den Brutschrank bei 37 Grad gestellt wurde. Dabei waren die Anschlüsse für die vorgeschaltete Luftwaschflasche wie auch für die Analysenwaschflasche bereits an der Flasche mit Blut angebracht und wurden erst nach Zusammenbau der ganzen Apparatur freigegeben. Nach 2 Stunden wurde das so überlebend gehaltene Blut nach derselben Methode auf seinen Ammoniakgehalt untersucht. Während nun die Werte der ersten Versuchsreihe den von Denis angegebenen Werten entsprachen, konnte ich in dem für 2 Stunden überlebend gehaltenen Blut bei derselben Versuchsanordnung nur noch ganz minimale Ammoniakwerte feststellen. Die Zahl der Leukozyten nahm den Versuchen Stockingers entsprechend in sehr verschiedenem Maße ab. Bei den Versuchen der zweiten Reihe fand ich folgende Werte, umgerechnet auf 100 ccm Vollblut:

Tabelle 2.

Nr.	Leukozyten	Ammoniak
1	5400	0,1132 mg%
2	8930	0,158 „
3	7300	0,076 „
4	6220	0,0346 „
5	4200	— „
6	9780	0,152 „
7	8240	0,076 „
8	3960	— „
9	4250	0,112 „
10	7180	0,076 „

Die Nummern dieser Versuche entsprechen den Versuchsnummern der ersten Tabelle.

Bei der Ammoniakbestimmung der zweiten Versuchsreihe ließen sich nur ganz minimale Ammoniakmengen feststellen, die oft so minimal sind, daß ihr Vorhandensein sogar im Bereich der möglichen Fehlergrenze liegen könnte. Aus der zweiten Versuchsreihe ergibt sich also, daß nicht nur kein NH_3-Zuwachs in vitro nachweisbar ist, sondern daß sogar das ursprünglich vorhandene NH_3 bis auf minimale Zahlen verschwindet. Fraglich ist nun, wo der in der ersten Versuchsreihe gefundene Ammoniak geblieben ist. Da ich die 5 ccm Citratblut unter Luftabschluß überlebend gehalten habe, ist ein Entweichen des Ammoniaks, an das man zunächst denken müßte, unmöglich gemacht. Man könnte vielleicht annehmen, daß das Ammoniak mit der sich bildenden Milchsäure eine Verbindung eingeht, zu Ammoniumlaktat, die sich schwer wieder lösen läßt. Auf diese Weise könnten bei der durchschnittlichen Milchsäurebildung von 90 mg% im Normalblut Mengen bis zu 17 mg% Ammoniak gebunden werden.

Andererseits wäre daran zu denken, daß Ammoniak im überlebenden Blut chemisch umgebaut wird, im Sinne einer Synthese zu Harnstoff.

Versuche, eine etwaige Bindung des Ammoniaks an Milchsäure durch stärkere Alkalisierung zu lösen, scheiterten. So nahm ich statt 3 ccm Soda erstens 2 ccm Soda + 1 ccm 1/10 n-Natronlauge, zweitens 1 ccm Soda + 2 ccm Natronlauge, drittens 3 ccm Natronlauge. Selbst durch diese starke Alkalisierung ließ sich in der Waschflasche kein Ammoniak nachweisen.

Neben den beiden oben angegebenen Versuchsreihen (Tab. 1 u. 2) stellte ich Kontrollversuche an. So tat ich zu den 5 ccm Citratblut, das ich für die Versuche nach 2 Stunden in den Brutschrank bei 37 Grad stellte, eine Messerspitze Oxalat, um die Zellelemente des Blutes zu Grunde gehen zu lassen, d. h. um die Glykolyse aufzuheben. Bei diesen so angestellten Kontrollversuchen erhielt ich nach 2 Stunden dieselben Ammoniakwerte wie bei den jeweiligen Grundversuchen.

Bei weiteren Kontrollversuchen stellte ich 5 ccm Citratblut für 2 Stunden in einen Brutschrank bei 56 Grad, wodurch die Fermente des Blutes inaktiviert wurden. Bei dieser Inaktivierung soll nach Rohny und Ascodi die Glykolyse aufgehoben sein, während Zucker weiter gebildet wird.

So fand ich: Versuch Nr. 8 Tabelle 1:

	Leukozyten	Ammoniakwert	Blutzucker
	5590	1,284 mg%	0,074
nach 2 Stunden:	—	1,094 mg%	0,070

Weitere Versuche dieser Art ergeben ähnliche Werte, d. h. im Blut, das für 2 Stunden in einem Brutschrank bei 56 Grad gestellt war, fand ich etwas geringere Ammoniakwerte, als den jeweiligen Grundversuchen entsprach. Eine Vermehrung des Zuckers, wie Ascodi und Rohny angeben, konnte ich nicht feststellen; dagegen zeigte sich bei den Versuchen eine geringe Zuckerabnahme. Die leichte Ammoniakverminderung mag innerhalb der möglichen Fehlergrenze liegen oder auf der doch eingetretenen Blutzuckerverminderung bzw. Milchsäurebildung beruhen, sodaß vielleicht durch die doch eingetretene geringe Glykolyse die fehlende Ammoniakmenge an die entstandene Milchsäure gebunden ist.

Zusammenfassung.

1. Im Citratblut werden nach der Methode von Folin und Denis in 15 Versuchen Werte von 0,76 mg% bis 1,88 mg% gefunden.

2. Im in vitro überlebend gehaltenen Citratblut, das für 2 Stunden in den Brutschrank bei 37 Grad gestellt wurde, sind nur noch ganz geringe Ammoniakwerte feststellbar.

3. Für die Bildung von Milchsäure aus Eiweiß durch Desaminierung konnte kein Anhalt gefunden werden.

Zum Schluß sei es mir gestattet, Herrn Privat-Dozenten Dr. W. Stockinger für die Ueberlassung der Arbeit und für die freundliche Beratung meinen Dank auszusprechen.

Literaturverzeichnis.

Ascodi: Biochem. Z. 192, 8 (1928).
Folin und Denis: Journ. biol. chem. 11, 527 (1912).
Folin: Journ. biol. chem. 88 (1930).
Hahn: Berl. klin. Wschr. (1891) Nr. 4.
Kraske: Biochem. Z. 45, 81 (1912).
v. Noorden: Biochem. Z. 45, 94 (1912).
Parnas: Biochem. Z. 155, 247 (1925).
Parnas und Heller: Biochem. Z. 152, 1 (1924).
Parnas und Taubenhaus: Biochem. Z. 159, 298 (1925).
Parnas und Klesicki: Biochem. Z. 159, 255 (1926).
Partos und Herzog: Pflügers Arch. 227, 226 (1931, 1930).
Partos: Pflügers Arch. 229, 336 (1932).
Rohny: Biochem. Z. 192 (1928).
Stockinger und Freese: Z. exper. Mde. 86, Heft 3 und 4.
Stuber und Lang: Biochem. Z. 179, 70 (1926).

Lebenslauf.

Am 26. 8. 1911 wurde ich, Hans Arkenau, als Sohn des Rechtsanwalts und Notars Dr. jur. Hans Arkenau in Wilhelmshaven-Rüstringen geboren. Nach 12jährigem Besuch des Kaiser-Wilhelm-Gymnasiums zu Wilhelmshaven bestand ich Ostern 1930 die Reifeprüfung. In Göttingen, München, Jena und Kiel studierte ich Medizin und legte am Ende des 5. Semesters in Jena die medizinische Vorprüfung ab. Am 16. 1. 1936 habe ich in Kiel das medizinische Staatsexamen bestanden. Seit dem 17. 1. 1936 bin ich Medizinalpraktikant in der Universitäts-Hautklinik Kiel.